

## **AValiação DO ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN DO AMBULATÓRIO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO–HU UFPI**

*Taynáh Emannuelle Coelho de Freitas (Bolsista PIBIC/UFPI), Regina Célia de Assis (Orientadora, Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI), Juliana Gomes Marreiros de Sousa (Colaboradora, UFPI), Marina da Paz Higino (Colaboradora, UFPI)*

### **Introdução**

As doenças inflamatórias intestinais (DII), que incluem a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI), são desordens crônicas de causas multifatoriais. A Doença de Crohn é uma desordem inflamatória crônica e transmural que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a orofaringe até a região perianal, sendo mais comumente encontrada na mucosa do íleo terminal<sup>1</sup>.

Estudos indicam uma participação de fatores genéticos, ambientais, dieta, microflora intestinal e resposta imune na etiologia das DII<sup>2</sup>. A resposta imunológica anormal da mucosa, entre outros fatores, determina a cascata imunoinflamatória que resulta em lesão continuada da mucosa do intestino<sup>3</sup>. Como a doença de Crohn é uma inflamação crônica, a ativação das células imunes leva à produção de mediadores da inflamação e espécies reativas do oxigênio (ERO)<sup>4</sup>.

A geração excessiva de radicais livres conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o potencial dano oxidativo a células e tecidos<sup>5</sup>. Dessa forma, as ERO têm uma forte participação na patogênese de muitas doenças<sup>6</sup>, o que demonstra a importância do presente estudo, que teve como objetivo investigar o desequilíbrio oxidativo através da dosagem de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no plasma de pacientes com diagnóstico de doença de Crohn, que estavam em tratamento no Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e correlacionar com o perfil lipídico dos mesmos.

### **Metodologia**

As informações sobre estilo de vida, doenças inflamatórias e dados socioeconômicos foram obtidas através de questionário previamente elaborado. Os dados do exame físico foram obtidos através de medidas antropométricas: altura e peso.

Coletou-se 10 mL de sangue por punção venosa dos voluntários após jejum de 12 horas. As amostras foram coletadas por técnico do Hospital Universitário e, em seguida, colocadas em dois tubos de análise a vácuo, um contendo heparina e o outro, gel separador. Em seguida, os tubos foram levados ao laboratório de Bioquímica-UFPI e centrifugado por 5 minutos para obtenção de soro e plasma utilizados na determinação do perfil lipídico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve como reagente primordial o FOX2. Depois de preparado, fez-se a análise espectrofotométrica do FOX2 e do FOX2 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuja absorvância foi medida entre 300 a 750 nm. O branco foi o Metanol-HPLC.

A dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no plasma foi feita em triplicata, utilizando-se 6 eppendorfs, nos quais foram colocados 90µL de plasma. Em três deles, acrescentou-se 10µL de TPP (trifenilfosfina) e, nos outros três, 10µL de metanol (HPLC-grade). As amostras foram vortexadas e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 900µL de FOX2 às amostras, que

foram novamente vortexadas e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, as amostras foram colocadas em uma microcentrífuga (Sigma) à temperatura de 20°C por 10 minutos. A leitura das absorvâncias do sobrenadante obtido das amostras após a centrifugação foi feita em espectrofotômetro a 560 nm, tendo o FOX2 como zero. Posteriormente, foi feita a determinação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do plasma usando a curva de calibração para concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com  $r = 0,9998$ , através da diferença entre as médias das absorvâncias encontradas nas amostras com e sem TPP<sup>7</sup>.

A classificação da gravidade da doença de Crohn foi determinada através do CDAI (Índice de Atividade da Doença de Crohn) para diferenciar a doença em ativa ou em remissão. O CDAI < 150 indica remissão da doença, enquanto o CDAI > 150 indica que a doença está ativa. O CDAI entre 150 e 250 indica estado leve; CDAI entre 250 e 350, estado moderado e maior que 350, grave<sup>8,9</sup>.

O colesterol total, o HDL-colesterol e os triglicerídeos foram determinados em duplicata por método colorimétrico enzimático, seguindo-se as instruções do fabricante (Labtest®). O LDL-colesterol foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Friedwald, na qual LDL-colesterol = CT – (HDL-colesterol + TG/5)<sup>10</sup>.

Para as análises estatísticas os dados foram tabulados e processados pelo programa SPSS para Windows® versão 10.0 (SPSS Inc., 2000), para verificar a existência de associação entre as variáveis em estudo utilizando-se a correlação de Pearson e considerando o nível de significância de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

## Resultados e discussão

A amostra foi constituída de 28 participantes que foram subdivididos em dois grupos. O grupo caso foi formado por 14 pacientes com diagnóstico de doença de Crohn, sendo 57,1% destes do sexo masculino e 42,9% do sexo feminino. O grupo controle foi constituído por 14 voluntários saudáveis, sendo metade do grupo (50,0%) pertencente ao sexo masculino e a outra metade (50,0%) ao sexo feminino.

Constatou-se a não existência de fumantes na amostra total, sendo 7,1% e 14,3% dos participantes ex-fumantes e 92,9% e 85,7% não fumantes nos grupos controle e caso respectivamente. Os que ingeriam bebidas alcoólicas no grupo controle somaram-se 35,7%, e no grupo caso apenas 7,1%. Ambos os parâmetros acima citados são importantes na investigação do nível plasmático de radicais livres, uma vez que o fumo e a ingestão de bebidas alcoólicas são fatores exógenos que podem precipitar o estresse oxidativo<sup>5</sup>.

Em relação à faixa etária, as médias das idades dos grupos controle e caso foram 32,50±10,66 e 40,00±12,64 anos, respectivamente. A média do IMC da amostra controle foi 24,24±3,96 Kg/m<sup>2</sup> e do grupo portador da doença de Crohn foi 22,14±3,84 Kg/m<sup>2</sup>, mostrando que os participantes apresentaram IMC normal, de acordo com a Diretriz Brasileira de Obesidade (2009)<sup>11</sup>.

Nas dosagens dos componentes do perfil lipídico da amostra total, foram encontrados valores considerados normais para colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c), LDL-colesterol (LDL-c) e triglicerídeos (TG) de acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007)<sup>12</sup>.

O nível de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) encontrado foi maior nos pacientes com doença de Crohn. No grupo controle a média de peróxido de hidrogênio foi igual a  $0,47 \pm 0,28$ , enquanto no grupo caso (Crohn) a média foi  $0,79 \pm 0,43$ . Ficou demonstrado não haver correlação entre o perfil lipídico e a concentração de  $H_2O_2$  nos grupos caso e controle, uma vez que  $p > 0,05$ .

A média do Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI) dos pacientes participantes foi de  $122,38 \pm 127,38$ , demonstrando que os indivíduos estavam em fase de remissão da doença (CDAI < 150), excetuando-se apenas dois pacientes (12,5%) que apresentaram CDAI > 150, indicando que a doença estava em sua fase ativa.

### Conclusão

Diante das análises deste estudo pôde-se concluir que não houve correlação significativa entre o perfil lipídico e a concentração plasmática de peróxido de hidrogênio, tanto no grupo controle como no grupo caso, mesmo tendo sido observados níveis elevados desse marcador nos pacientes portadores da doença de Crohn.



### Apoio:

### Referências

1. COHEN, D.; BIN, C. M.; FAYH, A. P. T. Assessment of quality of life of patients with inflammatory bowel disease residing in southern Brazil. **Arq Gastroenterol**, v.47, n.3, 2010.
2. SALVIANO, F. N., BURGOS, M. G. P., et al. Perfil socioeconômico e nutricional de pacientes com doença inflamatória intestinal internado em um Hospital Universitário. **Arq. Gastroenterol**, v.44, n.2, p.99-106, 2007.
3. LANNA, C. C. D.; FERRARI, M. L. A. et al. Manifestações articulares em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. **Rev Bras Reumatol**, v.46, supl.1, p.45-51, 2006.
4. PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med.**, v.347, p.417-429, 2002.
5. BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores moduladores. **Rev. Nutri.**, Campinas, v.23, n.4, p 629-643, jul-ago, 2010.
6. WAKAMATSU, T. H.; DOGRU, M.; TSUBOTA, K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. **Arq Bras Oftalmol**, v.71, n.6, p.72-29, 2008.
7. NOUROOZ-ZADEH J. Ferrous íon oxidation in presence of xylenol Orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. **Methods in enzymology**, v.300, p. 58-62, 1999.
8. BRASIL. Portaria SAS/MS nº 858, de 04 de novembro de 2002. Aprova o Potocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Doença de Crohn -. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 nov 2002.
9. PONTTE, A. C. A. et al. Consensus guidelines for the management of inflammatory bowel disease. **Arq Gastroenterol**, v.47, n.3, p.313-325, 2010.
10. KRAUSE, M. P.; HALLAGE, T.; MICULIS, C. P.; GAMA, M. P. R.; SILVA, S. G. Análise do perfil lipídico de mulheres idosas em Curitiba – Paraná. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v.90, n.5, p.327-332, mai, 2008.
11. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA, Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 3ed. São Paulo, 2009.
12. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e prevenção da aterosclerose, v. 88, 2007.

**Palavras-chave:** Estresse Oxidativo. Doença de Crohn. Peróxido de Hidrogênio.